意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮中适宜泛酸水平[1]

雷春红　马兰婷　王红芳　胥保华*

（山东农业大学动物科技学院，泰安 271018）

摘　要：本研究旨在探索饲粮中泛酸水平对意大利工蜂蜜蜂幼虫发育、机体抗氧化能力及辅酶 A(CoA)合成相关酶基因表达的影响，以期得到蜜蜂幼虫阶段饲粮中泛酸的适宜水平。试验选取 1 日龄意大利蜜蜂工蜂幼虫 1 800 只，随机分为 5 组，每组 3 个重复，每个重复 120 只。5 组工蜂幼虫分别饲喂泛酸实测水平为 0.92（对照）、1.22、1.52、1.82、2.12 mg/g 的试验饲粮，饲喂至化蛹。分别取 5 日龄和 7 日龄幼虫测定体重、体成分、血淋巴生化指标、抗氧化指标、CoA 合成相关酶基因的相对表达量，并计算幼虫的化蛹率和羽化率。结果表明：1）饲粮中添加泛酸可显著提高虫体鲜重、干重以及粗脂肪含量（$P<0.05$）；并且当泛酸水平为 2.12 mg/g 时，幼虫的羽化率显著高于其他组（$P<0.05$）。2）饲粮中泛酸水平对 5 日龄工蜂幼虫血淋巴中总蛋白（TP）、总胆固醇（TCHO）、高密度脂蛋白（HDL）、低密度脂蛋白（LDL）含量有显著影响（$P<0.05$），且分别在 1.82、1.82、1.22、1.52 mg/g 组含量最低。3）5 日龄和 7 日龄虫体总抗氧化能力（T-AOC）以及 5 日龄虫体超氧化物歧化酶（SOD）活性随饲粮泛酸水平的升高而显著升高（$P<0.05$）。4）饲粮泛酸水平显著影响 5 日龄幼虫泛酸激酶 4 基因和磷酸泛酰-半胱氨酸脱羧酶基因的相对表达量（$P<0.05$），且均在泛酸水平为 1.82 mg/g 时相对表达量最高。分别以 5 日龄虫体的干重和羽化率作拟合曲线，获得意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮中适宜的泛酸水平为 1.85～2.01 mg/g。

中图分类号：S816　文献标识码：A　　文章编号：

花粉、花蜜等蜜蜂天然饲料中含有丰富的泛酸[1-2]。研究表明，泛酸具有促生长[3]、抗

收稿日期：2016-06-13
基金项目：国家蜂产业体系建设专项资金（CARS-45）；山东省农业良种工程项目（2014—2016）
作者简介：雷春红（1990—），女，山西吕梁人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学。E-mail: 15621566860@163.com
*通信作者：胥保华，教授，博士生导师，E-mail：　bhxu@sdau.edu.cn

氧化[4-5]、提高学习记忆能力[4]和增强肠道免疫力[5]的功能。因此，研究蜜蜂对泛酸的营养需要量对蜜蜂的健康养殖具有重要的指导意义。近年来，泛酸在家禽、反刍动物、小鼠及水产动物上研究的较多。研究发现，泛酸可提高肉仔鸡粗蛋白质、粗脂肪及钙、磷的代谢率[6]；成年反刍动物瘤胃可合成生长所需泛酸，但对于瘤胃功能不全的幼年反刍动物，饲粮中需额外补充泛酸以促进其生长[3]；饲粮中添加泛酸可提高小鼠的脂质抗氧化能力以及学习和记忆能力[4]；饲料中添加泛酸可提高草鱼肠道黏膜免疫能力及抗氧化能力[5]。目前泛酸在昆虫上的研究较少，仅有的文献表明，泛酸是家蚕必需的B族维生素之一[7]；热暴露果蝇可通过补充泛酸缓解热应激，进而延长其存活时间[8]。有研究认为泛酸可促进蜜蜂王浆腺的发育，亦可作为蜂王浆新鲜度的评价指标[9]。泛酸在生物体内主要以辅酶A（CoA）和酰基载体蛋白（ACP）的形式发挥作用[10]。CoA是碳水化合物、脂肪和氨基酸代谢中许多乙酰化反应的重要辅酶，而ACP在脂肪酸碳链的合成中能发挥相当于CoA的作用[11]。在蜜蜂体内，泛酸通过泛酸激酶4（pantothenate kinase 4，PANK4）形成4’-磷酸泛酰巯基乙胺，也可通过磷酸化形成4’-磷酸泛酸，再分别在磷酸泛酰-半胱氨酸合成酶（phosphopantothenoylcysteine synthetase，PPCS）和磷酸泛酰-半胱氨酸脱羧酶（phosphopantothenoylcysteine decarboxylase，PPCDC）的作用下形成4’-磷酸泛酰巯基乙胺，最终在双官能CoA合成酶（bifunctional coenzyme A synthase，BCoAS）的作用下形成CoA，通过乙酰化参加三大营养物质的代谢[12]。目前，关于泛酸对蜜蜂的营养价值、生理功能的研究甚少，蜜蜂对泛酸的营养需要更是未见报道。鉴于此，本试验通过研究饲粮泛酸水平对意大利蜜蜂幼虫生长发育、抗氧化能力、生理功能及CoA合成相关酶基因表达的影响，探明意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮中泛酸的适宜水平。

1 材料与方法

1.1 饲粮组成

基础饲粮参考Vandenberg等[13]的配方进行配制，在基础饲粮的基础上设计5个泛酸添加梯度，其他营养成分保持不变，形成4种试验饲粮，其组成及营养水平见表1。试验饲料中泛

酸添加形式为*D*-泛酸钙（泛酸钙含量为98.30%，其中活性泛酸含量为91.62%，山东新发药业有限公司生产，批号：鲁【饲】【添】字2014125001），采用高效液相色谱法实测5种试验饲粮中泛酸水平分别为0.92（对照）、1.22、1.52、1.82、2.12 mg/g。配制好的饲粮于4 ℃保存备用。

表1　试验饲粮组成及营养水平（鲜重基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of experimental diets （fresh weight basis）　　%

项目	泛酸水平 PA level/(mg/g)				
Items	0.92	1.22	1.52	1.82	2.12
原料 Ingredients					
蜂王浆 Royal jelly	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
葡萄糖 Fructose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
果糖 Glucose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
酵母提取物 Yeast extrac	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
无菌水 Sterile water	37.00	36.97	36.94	36.91	36.88
泛酸 PA		0.03	0.06	0.09	0.12
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels					
总能 GE/（MJ/kg）	6.36	6.36	6.36	6.36	6.36
粗蛋白质 CP/%	8.44	8.44	8.44	8.44	8.44
泛酸 PA/(mg/g)	0.92	1.22	1.52	1.82	2.12

1.2　试验设计与饲养管理

选取群势相当的姐妹蜂王群为供试蜂群，在姐妹蜂王群中用移虫针移取1 800只1日龄蜜蜂幼虫至24孔培养板板中（每孔加入300 μL饲粮，提前预热），根据单因素完全随机设计分为5组，每组3个重复，每个重复120只幼虫，分别饲喂泛酸水平为0.92、1.22、1.52、1.82、2.12 mg/g的饲粮，将培养板放入15%甘油保湿液（$V_{甘油}$：$V_{水}$=3:17）于培养箱中饲养[14]（温

度：34.5 ℃；相对湿度：95%）。每天换料1次。培养至第7天，幼虫开始排便时，将幼虫转移到铺有无菌垫纸的24孔培养板化蛹（停止饲喂），培养箱温度保持在34.5 ℃，相对湿度保持在75%。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 幼虫体重的测定

每个重复随机选取3只5日龄幼虫和2只7日龄幼虫于EP管中（EP管已烘干至恒重，并记录其重量），用分析天平进行称重，该重量与EP管重之差记为鲜重，然后在（102±2） ℃烘箱中烘干至恒重，此重量与EP管重之差记为干重。

1.3.2 虫体粗蛋白质含量的测定

每个重复随机选取5日龄和7日龄的工蜂幼虫各2只称重，然后于65 ℃烘干称重。将试样无损的加入到凯氏消化管中，加入五水硫酸铜0.4 g和无水硫酸钠6 g，再加入浓硫酸10 mL，将消化管在通风柜里的消化炉上消化5 h。待消化液澄清冷却后，用VELP全自动凯氏定氮仪进行滴定，记录滴定所用盐酸体积。粗蛋白质含量计算公式如下：

ω（CP）=（V_1-V_2）×c×0.014×6.25/m。

式中：ω（CP）为粗蛋白质含量（%）；c为盐酸标准滴定溶液浓度（mol/L）；m为试样质量（g）；V_1为滴定试样时所需盐酸标准滴定溶液体积（mL）；V_2为空白滴定所需盐酸标准滴定溶液体积（mL）。

1.3.3 虫体粗脂肪含量的测定

每个重复随机选取5日龄和7日龄的工蜂幼虫各2只称重，然后于65 ℃烘干称重。将试样置于5 mL离心管中，之后用玻璃棒[使用前用2 mL氯仿-甲醇溶液（2:1）进行润洗]捣碎样品，加入2 mL氯仿-甲醇溶液混匀，抽提24 h后3 000 r/min离心10 min，上清液转移至另一离心管中，向残液中加入2 mL氯仿-甲醇溶液，3 000 r/min离心10 min，上清液转入同一离心管；将1.2 mL 1.6%氯化钙溶液加入盛有上清液的离心管中，磁力搅拌器混匀，静置1 h，3 000 r/min

离心10 min，吸去上清液；将1 mL 2%氯化钙-氯仿-甲醇（3:8:4）混合液的上层液缓缓加入，3 000 r/min离心10 min，吸去上层液；下层液转入已知重量（m_1）的瓶中，70 ℃烘干后称重（m_2），m_2与m_1的差值即为虫体粗脂肪含量[15]。

1.3.4 血淋巴生化指标的测定

采用体积为20 μL的毛细管分别吸取5日龄和7日龄工蜂幼虫（各3只）血淋巴于加有苯基硫脲的1.5 mL离心管中，于-80 ℃进行保存。测定时，4 ℃条件下3 000 r/min离心10 min，取上清备用，采用日立7020型全自动生化分析仪测定幼虫血淋巴中总蛋白（TP）、甘油三酯（TG）、总胆固醇（TCHO）、高密度脂蛋白（HDL）和低密度脂蛋白（LDL）的含量。

1.3.5 抗氧化指标的测定

每个重复随机选取1只5日龄和7日龄的工蜂幼虫称重，按质量体积比1：9加生理盐水于离心管中进行组织匀浆，用生理盐水分别配置成10%和1%的匀浆液，4 ℃条件下3 000 r/min离心10 min后取上清备用。10%匀浆液用于测定虫体的丙二醛（MDA）含量和总抗氧化能力（T-AOC），1%匀浆液用于测定虫体的蛋白质浓度和超氧化物歧化酶（SOD）活性。MDA含量、SOD活性和T-AOC的测定分别采用MDA试剂盒（A003-1）、SOD试剂盒（A001-1）和T-AOC试剂盒（A015），以上试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。MDA含量、SOD活性和T-AOC均用虫体蛋白质浓度进行矫正。

1.3.6 CoA合成相关酶基因相对表达量的测定

采用Trizol法提取总RNA，使用反转录试剂盒（TaKaRa）将提取的总RNA样品反转录为cDNA，-20 ℃保存备用。取2 μL cDNA（4倍稀释）加入到20 μL荧光定量体系中，按照荧光定量PCR试剂盒（TaKaRa）操作指南，用美国ABI-7500型实时荧光定量PCR仪检测目的基因的相对表达量。目的基因引物设计参考序列来自于NCBI数据库，采用Primer 5.0进行引物设计，以β-肌动蛋白（β-actin）为内参基因，委托生工生物科技有限公司合成引物，引物序列如表2所示。

表2 基因引物序列

Table 2 Primer sequences of genes

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	产物长度 Product length/bp	登录号 Accession No.
支链氨基酸氨基转移	F:TGCAGGACCAGAACAATTACA	118	XM_003251951
BCAT	R:CCTTTGCCATCCTCCTAATG		
泛酸激酶4	F:TGTGTTGTTCCAATCCTCCTC	105	XM_006561760
PANK4	R:CCCTCCTCCACTGTTTCTTG		
磷酸泛酰-半胱氨酸合成酶	F:ATGCTATCCATCCACCACCT	120	XM_395052
PPCS	R:TTGTTGTCCCACCACTTGTT		
磷酸泛酰-半胱氨酸脱羧酶	F:CAATCGCGTACTATGGTGGA	100	XM_006563282
PPCDC	R:CAGTGTATTCGGGAAAGCGTA		
双官能CoA合成酶	F:CTGGACTTGCATTATTCCACAA	174	XM_006565446
BCoAS	R:TGTCCTTCAGTAATTTCATGACTCC		
β-肌动蛋白	F:CCGTGATTTGACTGACTACCT	142	NM-001185145
β-action	R:AGTTGCCATTTCCTGTTC		

1.3.7 化蛹率与羽化率的测定

每天观察幼虫生长情况，移出已死亡个体，分别统计成功化蛹个数和羽化出房数。

化蛹率（%）=（幼虫化蛹的个体总数/幼虫总数）×100；

羽化率（%）=（羽化出房的个体总数/幼虫化蛹数）×100[16]。

1.4　数据处理与分析

数据采用SAS 9.1.3统计软件中的一般线性模型（GLM）进行单因素方差分析（one-way ANOVA）和Duncan氏法多重比较，结果以平均值±标准误表示，以*P*＜0.05作为差异显著性判断标准。

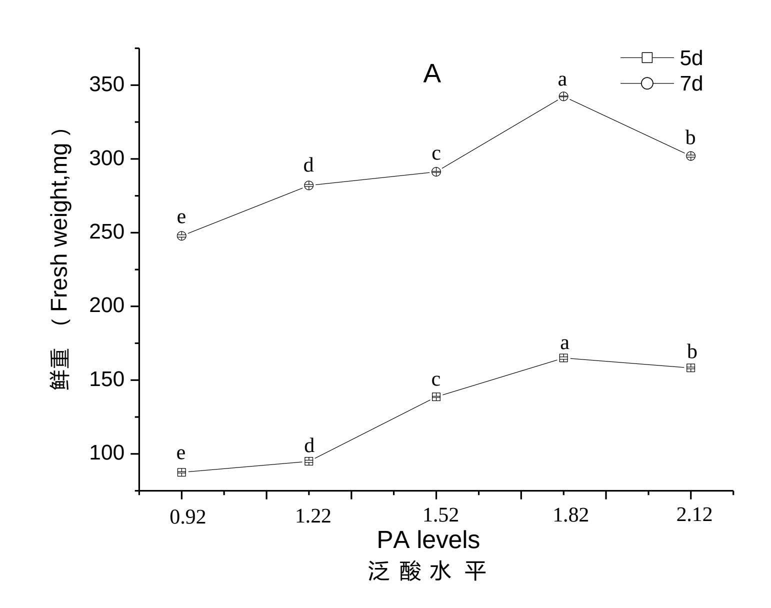
2　结　果

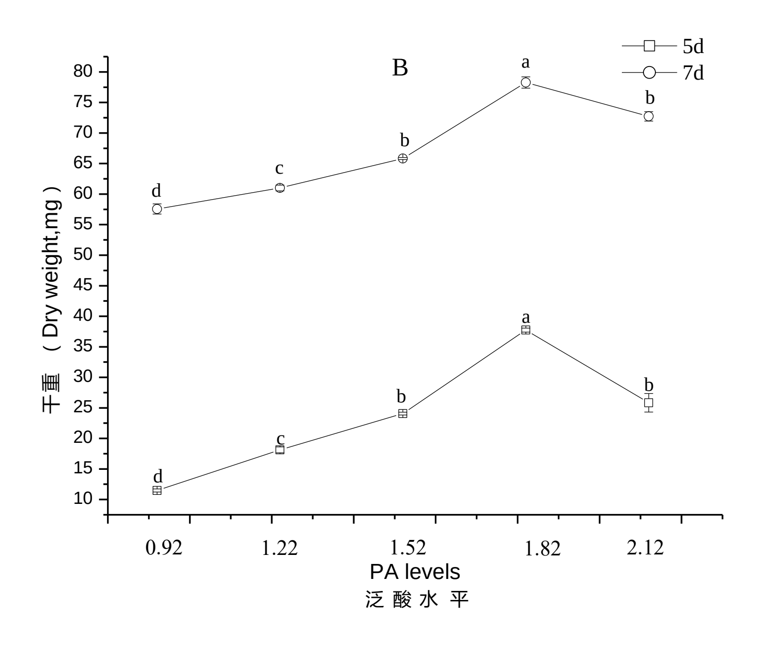
2.1　饲粮中泛酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫体重的影响

饲粮中泛酸的添加可显著提高5日龄和7日龄虫体的鲜重（*P*<0.05），且随着饲粮中泛酸水平的升高，5日龄和7日龄虫体的鲜重先升高后降低（图1-A）。饲粮中泛酸水平为1.82 mg/g时5日龄和7日龄虫体鲜重最高，且均显著高于其他各组（*P*<0.05），饲粮中泛酸水平为2.12 mg/g组次之。

同样，饲粮中泛酸的添加可显著提高5日龄和7日龄幼虫的干重（*P*<0.05），5日龄和7日龄虫体的干重随饲粮中泛酸水平的升高均先升高后降低（*P*<0.05），且均在饲粮中泛酸水平为1.82 mg/g时达到最高（图1-B）。

根据5日龄虫体干重和饲粮中泛酸水平作拟合回归曲线（图2），得出意大利工蜂幼虫饲粮中泛酸的适宜水平为1.85 mg/g。





数据点标注不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。图 2 同。

Date points with different small letters mean significant difference (*P*<0.05). The same as below.

图1　饲粮中泛酸水平对工蜂幼虫体重的影响

Fig.1　Effects of dietary PA levels on body weight of worker bee larvae

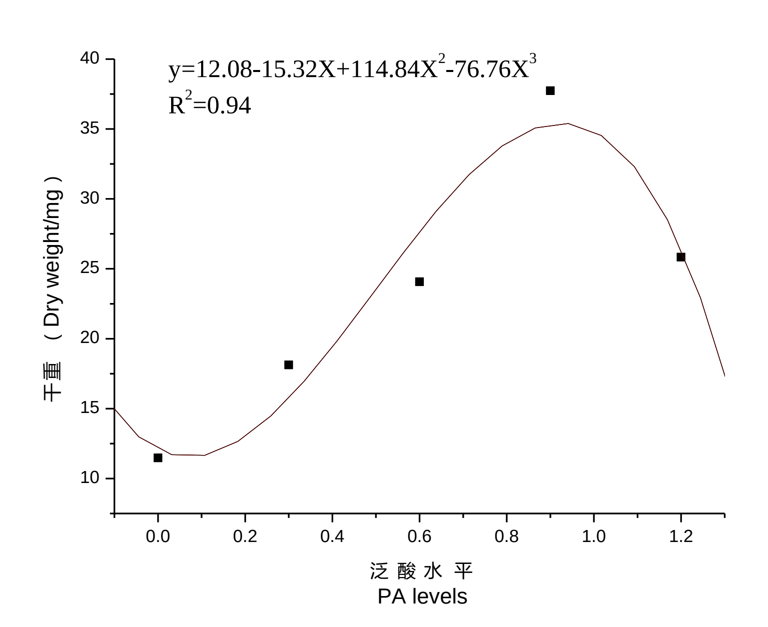


图2　饲粮中泛酸水平与5日龄虫体干重的回归分析

Fig.2　Regression analysis of dietary PA levels and dry weight of 5-day-old larvae

2.2　饲粮中泛酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫体成分的影响

由表3可以看出，饲粮中泛酸的添加可显著影响虫体中粗脂肪含量（P<0.05)，随着饲粮中泛酸水平的升高，5日龄和7日龄虫体中粗脂肪含量均不断升高，且在饲粮中泛酸水平为2.12 mg/g时达到最高，但与饲粮中泛酸水平为1.82 mg/g时无显著差异（P>0.05）。饲粮中添加泛酸对虫体中粗蛋白质含量无显著影响（P>0.05）。

表3　饲粮中泛酸水平对工蜂幼虫体成分的影响

Table 3　Effects of dietary PA levels on body composition of worker bee larvae　%

项目 Items	泛酸水平 PA level/(mg/g)					P值
	0.92	1.22	1.52	1.82	2.12	P-value
粗蛋白质 CP						
5 日龄 5-day-old	58.45±0.13	52.55±0.15	51.51±0.15	46.51±0.08	53.49±0.12	0.962 8
7 日龄 7-day-old	61.31±0.16	57.64±0.03	53.61±0.16	51.72±0.17	51.47±0.23	0.412 0
粗脂肪 EE						
5 日龄 5-day-old	20.57±0.23^{d}	21.20±0.10^{c}	22.09±0.01^{b}	23.59±0.12^{a}	23.79±0.07^{a}	<0.000 1
7 日龄 7-day-old	25.90±0.09^{d}	26.11±0.05^{c}	26.38±0.01^{b}	27.09±0.04^{a}	27.10±0.01^{a}	<0.000 1

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05）。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.3 饲粮中泛酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴生化指标的影响

由表4可以看出，饲粮中泛酸水平显著影响5日龄工蜂幼虫血淋巴中TP、TCHO、HDL和LDL含量（*P*<0.05）。与对照组相比，各泛酸添加组5日龄工蜂幼虫血淋巴中TP和HDL含量有显著降低（*P*<0.05），但随着饲粮中泛酸水平的升高，血淋巴中TCHO和HDL含量均先降低后升高，TCHO在饲粮中泛酸水平为1.82 mg/g时达到最低值，HDL在饲粮中泛酸水平为1.22 mg/g时达到最低值。

饲粮中泛酸的添加对7日龄工蜂幼虫血淋巴中TP、TG、HDL和LDL的含量均无显著影响（*P*>0.05），对血淋巴中TCHO含量有显著影响（*P*<0.05）。随着饲粮泛酸水平的升高，血淋巴中TCHO含量先降低后升高，且在饲粮中泛酸水平为1.82 mg/g时有最低值，但与饲粮中泛酸水平为1.52和2.12 mg/g时无显著差异（*P*>0.05）。

表4 饲粮中泛酸水平对工蜂幼虫血淋巴生化指标的影响

Table 4 Effects of dietary PA levels on biochemical indices in hemolymph of worker bee larvae

项目 Items	泛酸水平 PA level/(mg/g)					*P* 值 *P*-value
	0.92	1.22	1.52	1.82	2.12	
5 日龄 5-day-old						
总蛋白 TP	42.53±0.19^{a}	40.43±0.18^{c}	40.40±0.25^{c}	39.50±0.15^{d}	41.70±0.12^{b}	<0.000 1
甘油三酯 TG	0.70±0.011	0.69±0.02	0.69±0.01	0.68±0.01	0.69±0.01	0.793 4
总胆固醇 TCHO	0.41±0.01^{a}	0.40±0.01^{a}	0.39±0.02^{ab}	0.29±0.01^{c}	0.37±0.01^{ab}	<0.000 1
高密度脂蛋白 HDL	0.24±0.01^{a}	0.15±0.01^{c}	0.20±0.01^{b}	0.19±0.01^{b}	0.20±0.01^{b}	0.000 7
低密度脂蛋白 LDL	0.25±0.01^{a}	0.20±0.01^{b}	0.19±0.02^{b}	0.2±0.02^{ab}	0.2±0.02^{ab}	0.046 5

7 日龄 7-day-old						
总蛋白 TP	41.63±1.12	44.08±1.20	45.14±1.16	45.90±0.78	43.62±0.84	0.156 3
甘油三酯 TG	1.17±0.08	1.17±0.05	1.13±0.12	1.08±0.06	1.09±0.06	0.883 9
总胆固醇 TCHO	0.60±0.02[a]	0.58±0.02[a]	0.55±0.03[ab]	0.49±0.04[b]	0.54±0.02[ab]	0.038 2
高密度脂蛋白 HDL	0.30±0.03	0.26±0.03	0.27±0.02	0.28±0.02	0.28±0.01	0.611 5
低密度脂蛋白 LDL	0.25±0.01	0.23±0.02	0.21±0.04	0.22±0.04	0.24±0.02	0.823 5

2.4　饲粮中泛酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫抗氧化指标的影响

由表5可以看出，5日龄时，饲粮中泛酸水平可显著影响虫体T-AOC（P<0.05），随着饲粮中泛酸水平的升高，虫体T-AOC不断升高，组间差异显著（P<0.05），在饲粮中泛酸水平为2.12 mg/g时达到最高。饲粮中泛酸水平为1.22和1.52 mg/g时虫体MDA含量较高，显著高于饲粮中泛酸水平为0.92、1.82和2.12 mg/g时(P<0.05)。同时，饲粮中泛酸的添加可显著升高虫体SOD活性（P<0.05），且随着饲粮中泛酸水平的升高，虫体SOD活性不断升高，组间差异显著（P<0.05）。

7日龄时，饲粮中泛酸的添加可显著升高虫体T-AOC（P<0.05），随着饲粮中泛酸水平的升高，虫体T-AOC不断升高，且在饲粮中泛酸水平为1.82 mg/g时达到最高。饲粮中泛酸水平对虫体MDA含量及SOD活性无显著影响（P>0.05）。

表5　饲粮中泛酸水平对工蜂幼虫抗氧化指标的影响

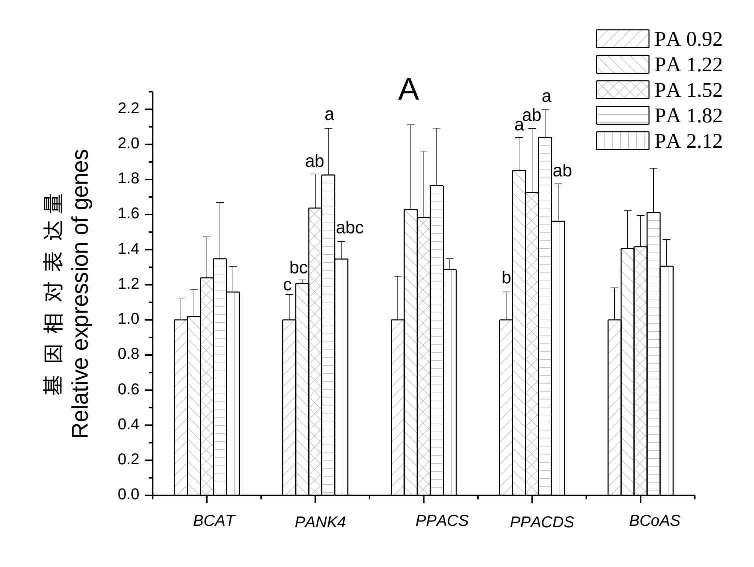
Table 5　Effects of dietary PA levels on antioxidant indices of worker bee larvae.

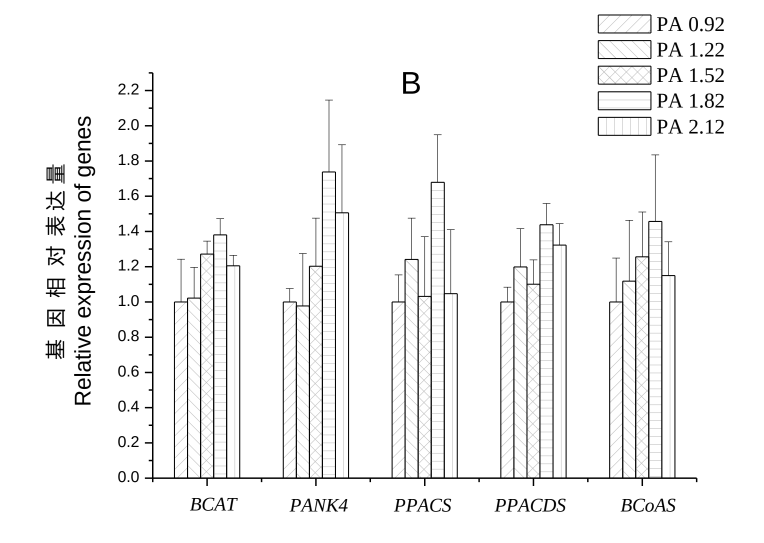
项目 Items	泛酸水平 PA level/(mg/g)					*P*值 *P*-value
	0.92	1.22	1.52	1.82	2.12	
5日龄						

5-day-old						
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg prot)	3.03±0.04^{e}	4.18±0.07^{d}	4.36±0.03^{c}	5.05±0.03^{b}	5.96±0.09^{a}	<0.000 1
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	0.44±0.02^{cd}	0.83±0.02^{a}	0.52±0.01^{b}	0.46±0.01^{c}	0.41±0.01^{d}	0.006 3
超氧化物歧化 SOD/（U/mg prot）	48.49±0.77^{e}	50.58±0.14^{d}	52.72±0.09^{c}	55.49±0.13^{b}	59.47±0.18^{a}	0.014 6
7日龄 7-day-old						
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg prot)	6.70±0.06^{d}	7.05±0.07^{c}	8.50±0.09^{b}	9.04±0.09^{a}	9.02±0.05^{a}	0.015 6
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	0.40±0.01	0.41±0.01	0.32±0.01	0.35±0.01	0.32±0.01	0.546 8
超氧化物歧化酶 SOD/（U/mg prot）	50.23±0.14	53.49±0.14	56.27±0.07	54.53±0.10	55.61±0.16	0.094 3

2.5 饲粮中泛酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫CoA合成相关酶基因表达的影响

由图3-A可看出，与对照组相比，1.52和1.82 mg/g泛酸组5日龄幼虫*PANK4*的相对表达量显著升高（*P*<0.05），1.22和1.82 mg/g泛酸组5日龄幼虫*PPCDC*的相对表达量显著升高（*P*<0.05）。由图3-B可看出，饲粮中泛酸的添加提高了7日龄幼虫CoA合成相关酶基因的相对表达量，但均未达到显著水平（*P*>0.05）。





图A，5日龄工蜂幼虫CoA合成相关酶基因的相对表达量；图B，7日龄工蜂幼虫CoA合成相关酶基因的相对表达量。

Figure A, relative expression levels of CoA synthesis related enzyme genes of 5-day-old worker bee larvae; figure B, relative expression levels of CoA synthesis related enzyme genes of 7-day-old worker bee larvae.

图3　饲粮中泛酸水平对工蜂幼虫CoA合成相关酶基因相对表达量的影响

Fig.3　Effects of dietary PA level on relative expression levels of CoA synthesis related

enzyme genes of worker bee larvae

2.6 饲粮中泛酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫化蛹率和羽化率的影响

由表6可知，饲粮中泛酸水平对幼虫的化蛹率无显著影响（$P>0.05$），但可显著影响幼虫的羽化率（$P<0.05$）。随着饲粮中泛酸水平的升高，羽化率呈上升趋势，其中1.82和2.12 mg/g泛酸组较对照组显著升高（$P<0.05$），但这2组之间并无显著差异（$P>0.05$）。

根据幼虫羽化率和饲粮中泛酸水平做拟合曲线方程（图4），得出意大利工蜂幼虫饲粮中泛酸的最适水平为2.01 mg/g。

表6　饲粮中泛酸水平对工蜂幼虫化蛹率及羽化率的影响

Table 6　Effects of dietary PA levels on pupation and eclosion rates of worker bee larvae　%

项目 Items	泛酸水平 PA levels/(mg/g)					*P*值 *P*-value
	0.92	1.22	1.52	1.82	2.12	
化蛹率 upation rates	86.11±3.67	87.50±4.81	84.72±3.67	86.11±3.67	84.72±1.39	0.978 9
羽化率 Eclosion rates	80.57±0.85[b]	80.84±1.06[b]	82.01±1.22[b]	88.77±1.24[a]	90.16±1.16[a]	<0.000 1

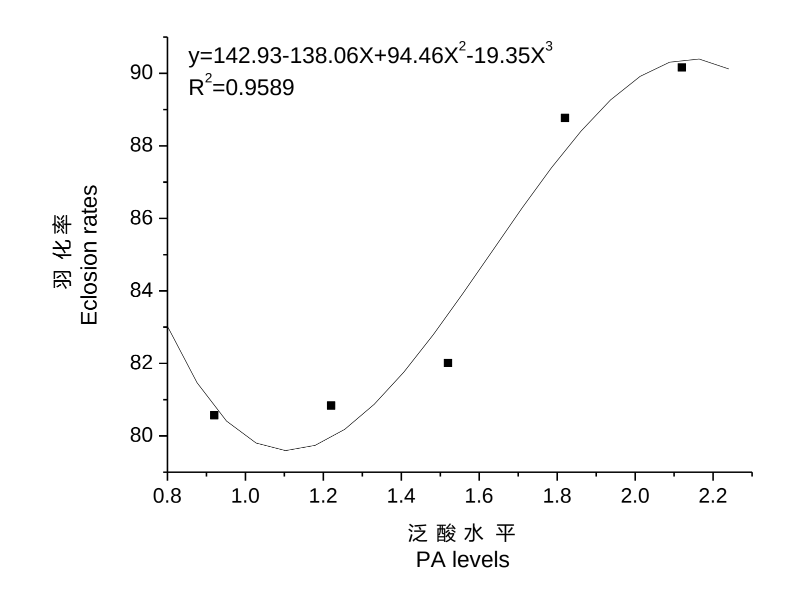


图4 饲粮中泛酸水平与工蜂幼虫羽化率的回归分析

Fig.4 Regression analysis of dietary PA levels and eclosion rate of worker bee larvae

3 讨 论

3.1 饲粮中泛酸水平影响意大利蜜蜂工蜂幼虫的发育

蜜蜂的生长发育为变态发育，其一生要经历卵、幼虫、蛹和成蜂4个阶段，每个阶段的正常生长都基于蜜蜂的营养状态与机体对于外界环境的抵抗能力。泛酸是CoA的前体物质，CoA在生物体内参与蛋白质的合成转化和脂质的代谢，泛酸亦可通过酰基载体蛋白的形式促进脂肪酸的合成[5,17]，脂质与蛋白质代谢的平衡对于蜜蜂的发育至关重要。化蛹率反映了蜜蜂从幼虫期过渡到蛹期的成功率，羽化率则反映了蜜蜂幼虫从蛹阶段过渡到成蜂阶段的成功率，化蛹率和羽化率的提高表明泛酸对于蜜蜂的发育有促进作用。在本研究中，饲粮中泛酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫的化蛹率无显著影响，但是泛酸添加组的化蛹率普遍高于未添加泛酸的对照组；泛酸的添加可显著提高幼虫羽化率，当饲粮中泛酸水平为2.12 mg/g，羽化率达到了最高。刘安龙等[18]研究表明，适量泛酸的添加可提高草鱼的粗蛋白质和粗脂肪含量；黄凤等[19]关于吉富罗非鱼的研究表明，适量泛酸的添加可提高鱼体的粗脂肪含量，降低肝脏中粗脂肪含量。蜜蜂没有肝脏组织，但其脂肪体有相当于肝脏的功能[16]。在本研究中，饲粮中适量泛酸可提高意大利工蜂幼虫虫体粗脂肪的沉积，升高5日龄和7日龄工蜂幼虫的体重，这与鱼类中关于草鱼[5,18]、蓝罗非鱼[20]、军曹鱼[21]及吉富罗非鱼[19]，禽类中关于种鸡[22]、肉仔鸡[6]及鹅[23]的研究结果相一致，推测泛酸影响蜜蜂化蛹率及羽化率的机理可能为泛酸通过酰基载体蛋白的形式促进脂肪的合成[6]，为蜜蜂蜕皮储备能量。

昆虫的血淋巴同时具有血液与淋巴液的功能，血液的营养物质来自消化器官的代谢产物和组织细胞的分解产物，血液生化性能的稳定反映了机体的健康状态[24]。TP贮存含量的多少直接影响昆虫的变态发育，是昆虫组织构架的重要来源[25]。血液中胆固醇含量的高低则反映了游离脂肪酸在机体内沉积的情况。从本试验的结果可看出，各泛酸添加组7日龄幼虫

血淋巴中TP含量高于未添加泛酸的对照组，说明泛酸的添加有利于工蜂幼虫TP的合成；而泛酸对于血淋巴中TG、TCHO、HDL、LDL含量的影响则相反，这说明泛酸的添加提高了营养物质的代谢。研究认为过多的TG、TCHO、LDL堆积对机体是不利的，易引发心血管疾病[26]，然而目前关于泛酸添加对于蜜蜂血淋巴TP、TG、TCHO、HDL和LDL含量的影响尚未见报道。

3.2　饲粮中泛酸水平影响意大利蜜蜂工蜂幼虫的抗氧化能力

目前，关于营养物质可提高蜜蜂的抗氧化能力已被广泛研究，然而泛酸是否可提高蜜蜂的抗氧化能力尚未见报道。在一个肿瘤细胞的体外试验中报道泛酸及其衍生物可以抵抗脂质抗氧化对细胞膜的损害作用[27]，表明泛酸有潜在的提高机体抗氧化性的能力。MDA是脂质过氧化的主要终产物之一，MDA的产生可加剧对细胞膜的损伤[28-29]，其含量是衡量和评价机体氧化损伤的重要标志物。T-AOC与SOD是抗氧化体系中的重要组成成分，其活性与机体清楚自由基的能力成正比，因此可以间接反映机体组织细胞的过氧化程度和自由基的产生情况。因此，虫体MDA含量越低、T-AOC越高、SOD活性越高，则反映虫体抗氧化状态越好。综合本试验结果表明，饲粮中泛酸水平为1.22～1.52 mg/g时，意大利蜜蜂工蜂幼虫的抗氧化状态最好。

3.3　饲粮中泛酸水平可影响虫体CoA合成相关酶基因的表达

支链氨基酸氨基转移酶(BCAT)可通过催化支链氨基酸氨基的转移促进泛酸的形成。PANK4在泛酸代谢的起始步骤发挥作用，是泛酸代谢形成CoA合成途径中的限速酶[30]。蜜蜂从饲粮中摄入的泛酸通过PANK4、PPCS、PPCDC和BCoAS的作用降解为CoA，进而参与营养物质的代谢。本试验结果显示，各泛酸添加组虫体CoA合成相关酶基因的相对表达量整体大于未添加泛酸的对照组，推测饲粮中泛酸的添加可通过提高CoA合成相关酶的表达进而促进CoA的形成。本研究表明泛酸的添加对于虫体*PANK4*和*PPCDC*的表达有显著影响，然而目前关于饲粮中泛酸水平对于其代谢相关酶的影响尚未见报道。本研究中各泛酸添加组虫体*BCAT*

的相对表达量均大于未添加泛酸的对照组，张国滨等[31]研究指出BCAT与神经胶质瘤的恶性程度呈正相关，然而目前关于泛酸与BCAT的研究大多集中在营养学领域，关于泛酸对于BCAT的影响尚未见报道。

4 结 论

分别以5日龄幼虫的干重和羽化率作拟合曲线，获得意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮中适宜的泛酸水平为1.85～2.01 mg/g。

参考文献：

[1] TODD F E,BRETHERICK O.The composition of pollens[J].Journal of Economic Entomology,1942,35(3):312–317.

[2] LOPER G M,STANDIFER L N,THOMPSON M J,et al.Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) Pollen and bee bread. Ⅰ-fatty acids,sterols,vitamins and minerals[J].Apidologie,1980,11(1):63–73.

[3] 王俊芳,刘强,杨效民.泛酸在反刍动物生产中的应用[J].江西饲料,2008(3):16–17.

[4] 丁玉琴.泛酸钙对全饥饿鼠的保护作用及其机理研究[D].硕士学位论文.上海:第二军医大学,2001.

[5] LI L,FENG L,JIANG W D,et al.Dietary Pantothenic acid deficiency and excess depress the growth,intestinal mucosal immune and physical functions by regulating NF-κB,TOR,Nrf2 and MLCK signaling Pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J].Fish & Shellfish Immunology,2015,45(2):399–413.

[6] 祁凤华,陈瑶,徐春生.泛酸对肉仔鸡营养物质代谢率影响的研究[J].黑龙江畜牧兽医:科技版,2009(15):36–37.

[7] 伊藤智夫,钟生泉,向仲怀.蚕的维生素营养[J].蚕学通讯,1985(2):12–19.

[8] 邱璐,郭俊生,赵法伋,等.泛酸钙、吡哆醛、叶酸及生物素对热暴露果蝇的保护作用[J].解放军预防医学杂志,2000,18(2):82–85.

[9] 罗雪雅.蜂王浆新鲜度指标筛选与缓解体力疲劳功能研究[D].硕士学位论文.重庆:西南大学,2008.

[10] KUO Y M,HAYFLICK S J,GITSCHIER J.Deprivation of pantothenic acid elicits a movement disorder and azoospermia in a mouse model of pantothenate kinase-associated neurodegeneration[J].Journal of Inherited Metabolic Disease,2007,30(3):310–317.

[11] 王荫长.昆虫生理学[M].北京:中国农业出版社,2004:65–65.

[12]Kanehisa L.Pentothenate and CoA bisynthesis[EB/OL].[2016-06-01].http:/www.kegg.jp/keggbin/showpathway?orgname=ame&mapno=00770&mapscale=&showdescription=hide,00770,9/21/16.

[13] VANDENBERG J D,SHIMANUKI H.Technique for rearing worker honeybees in the laboratory[J].Journal of Apicultural Research,1987,26(2):90–97.

[14] 张怡丁,张卫星,胥保华,等.人工饲养条件下意大利蜜蜂幼虫饲粮的适宜粗蛋白质水平[J].动物营养学报,2014,26(9):2722–2729.

[15] 马兰婷.代用花粉中 α-亚麻酸水平对蜜蜂采食量、群势及脂质代谢的影响[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2013.

[16] 赵凤奎,胥保华,王红芳.意大利蜜蜂工蜂幼虫饲料中适宜色氨酸水平[J].中国农业科学,2015,48(7):1453–1462.

[17] LIN Y H,LIN H Y,SHIAU S Y.Estimation of dietary pantothenic acid requirement of grouper,*Epinephelus malabaricus* according to physiological and biochemical parameters[J].Aquaculture,2012,324–325:92–96.

[18] 刘安龙.草鱼幼鱼对饲料中核黄素、生物素和泛酸需要量的研究[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2007.

[19] 黄凤,蒋明,文华,等.吉富罗非鱼对饲料中泛酸的需要量[J].水产学报,2014,38(9):1530–1537.

[20] ROEM A J,STICKNEY R R,KOHLER C C.Dietary pantothenic acid requirement of the blue tilapia[J].The Progressive Fish-Culturist,1991,53(4):216–219.

[21] SOLIMAN A K,WILSON R P.Water-soluble vitamin requirements of tilapia.1 pantothenic acid requirement of blue tilapia,*Oreochromis aureus*[J].Aquaculture,1992,104(1/2):121–126.

[22] BEER A E,SCOTT M L,NESHEIM M C.The effects of graded levels of pantothenic acid on the breeding performance of white leghorn pullets[J].British Poultry Science,1963,4(3):243–253.

[23] 张肖,王宝维,岳斌,等.泛酸对 5~16 周龄五龙鹅生长性能、屠宰性能、肌肉品质、营养物质利用率及血清生化指标的影响[J].动物营养学报,2015,27(11):3411–3419.

[24] WANG J P,YOO J S,KIM H J,et al.Nutrient digestibility,blood profiles and fecal microbiota are influenced by chitooligosaccharide supplementation of growing pigs[J].Livestock Science,2009,125(2/3):298–303.

[25] HAUNERLAND N H.Insect storage proteins:gene families and receptors[J].Insect Biochemistry and Molecular Biology,1996,26(8/9):755–765.

[26] 刘静,赵冬,秦兰萍,等.低密度脂蛋白胆固醇与心血管病发病关系的前瞻性研究[J].中华心血管病杂志,2001,29(9):561–565.

[27] 姜骅,唐成康.泛酸研究及其应用[J].四川食品与发酵,2004,40(1):11–13.

[28] SLYSHENKOV V S,RAKOWSKA M,MOISEENOK A G,et al.Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation[J].Free Radical Biology and Medicine,1995,19(6):767–772.

[29] BITZER-QUINTERO O K,DAVALOS-MARIN A J,ORTIZ G G,et al.Antioxidant activity of tryptophan in rats under experimental endotoxic shock[J].Biomedicine & Pharmacotherapy,2010,64(1):77–81.

[30] 杨延辉,赵建新,王浩,等.泛酸激酶及其抑制剂的研究进展[J].药学进展,2014,38(9):641–648.

[31] 张国滨,张晋,徐恒周,等.支链氨基酸氨基转移酶 1 在恶性胶质瘤中的表达及意义[J].中华神经外科杂志,2015,31(12).

Appropriate Dietary Pantothenic Acid Level for *Apis mellifera ligustica* Worker Bee Larvae[2]

LEI Chunhong　MA Lanting　WANG Hongfang　XU Baohua

(*College of Animal Science and Technology*, *Shandong Agricultural University*, *Taian* 271018, *Shandong*)

Abstract: The objective of this experiment was to research the influences of dietary pantothenic acid level on development, body antioxidant function and the expression of CoA synthesis related enzyme genes for *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae, and investigate to find the appropriate dietary pantothenic acid level in this stage. A total of 1 800 one-day-old *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae were randomly assigned to 5 groups with 3 replicates per group and 120 larvae per replicate. Larvae in 5 groups were fed with experimental diets with 0.92, 1.22, 1.52, 1.82 and 2.12 mg/g (measured values) pantothenic acid until pupate, respectively. The body weight, body composition, haemolymph biochemical indices, antioxidant indices and the relative expression levels of CoA synthesis related enzyme genes of 5- and 7-day-old larvae were measured, and then the pupation rate and eclosion rate were calculated. The results showed as

*Corresponding author, professor, E-mail:bhxu@sdau.edu.cn　　(责任编辑　菅景颖)

follows: 1) pantothenic acid supplementation could significantly increase the fresh weight, dry weight and ether extract (EE) content of larvae ($P<0.05$), and eclosion rate in 2.12 mg/g group was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$). 2) Dietary pantothenic acid level had significantly influences on total protein (TP), total cholesterol （TCHO）, high density lipoprotein （HDL） and low density lipoprotein （LDL） contents in haemolymph of 5-day-old larvae ($P<0.05$), meanwhile, they reached the minimum in 1.82, 1.82, 1.22, 1.52 mg/g, respectively. 3) The total anti-oxidant capacity （T-AOC） of 5- and 7-day-old larvae was significantly increased with the dietary pantothenic acid increasing ($P<0.05$), as well as the superoxide dismutase （SOD） of 5-day-old larvae. 4) Dietary pantothenic acid level significantly influenced the relative expression levels of pantothenate kinase 4 (*PANK4*) and phosphopantothenoylcysteine decarboxylase (*PPCDC*) of 5-day-old larvae ($P<0.05$), and both of them reached the maximum in 1.52 mg/g group. Considering dry weight and eclosion rate of 5-day-old larvae to make fitting curves, the appropriate dietary pantothenic acid level for *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae is 1.85 to 2.01 mg/g.

Key words: pantothenic acid; *Apis mellifera ligustica*; worker bee; larvae; appropriate level